褐飞虱中肠内膜结合短肽 P2S 的筛选

邵恩斯, 林立金, 关 雄*
(福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002)

摘要: 【目的】筛选与褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 中肠内膜相结合的短肽, 探索能阻断褐飞虱传播水稻病毒的新方法。【方法】通过改良的膜饲喂法和噬菌体短肽文库展示技术, 模拟褐飞虱正常取食的行为, 筛选能够与其中肠内膜结合的短肽。将筛选到的短肽与加强绿色荧光蛋白进行融合表达, 经纯化后, 将融合蛋白饲喂给褐飞虱若虫, 通过荧光显微镜观察饲喂后若虫的中肠。【结果】使用改良的膜饲喂法, 16 h 后褐飞虱若虫的取食率达到 91%, 24 h 后达到 95%。经形态学验证, 确定了一种短肽与褐飞虱中肠内膜具有结合活性, 并将其命名为 P2S。【结论】改良了针对褐飞虱的膜饲喂法, 筛选并验证了能够与褐飞虱中肠内膜结合的活性短肽 P2S。研究结果为阻断相关的水稻病毒与褐飞虱中肠内膜间的相互作用研究提供了科学依据, 也为褐飞虱新型膜穿孔毒素蛋白的研究提供了理论基础。

关键词: 褐飞虱; 膜饲喂法; 噬菌体短肽文库; 噬菌体展示技术; 中肠; 中肠内膜; 短肽
中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2013)03-0219-09

Screening of a peptide P2S binding to the midgut inner membrane in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

SHAO En-Si, LIN Li-Jin, GUAN Xiong* (Key Laboratory of Bio-pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: 【Aim】To screen peptides which may bind to the midgut inner membrane in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, so as to explore the new methods for blocking *N. lugens* to transmit rice viruses. 【Methods】Trophic behavior of nymphs of the rice brown planthopper was imitated with improved membrane feeding method. Through the use of this feeding method, the phage peptide library solution was fed to planthopper nymphs to screen peptides which may bind to the midgut inner membrane. Then, the fusion expression of peptide and enhanced green fluorescent protein was conducted, and the purified fusion protein was fed to nymphs of the planthopper. To confirm the binding activity of screened peptide, the green fluorescence of fusion protein in the midgut of the nymphs was observed under the fluorescence microscope. 【Results】The feeding rates of nymphs of the planthopper detected by improved membrane feeding method at 16 h and 24 h after treatment reached 91% and 95%, respectively. By observing the green fluorescence from planthopper gut, one peptide, named P2S, was determined as the planthopper gut inner membrane binding peptide. 【Conclusion】Membrane feeding method was well improved for the rice brown planthopper. A peptide P2S which may bind to the midgut inner membrane of the planthopper was effectively screened and its binding activity was confirmed. The results will provide a possibility of blocking interaction between rice viruses and the midgut inner membrane of the rice brown planthopper. Furthermore, the peptide P2S may be used for further study of the membrane insertion toxins binding to proper receptors in the midgut of the rice brown planthopper.

Key words: *Nilaparvata lugens*; membrane feeding; phage peptide library; phage display; midgut; midgut inner membrane; peptide

我国是世界上最大的水稻生产国, 年产量占世界总量的 32% ~ 35% (Maclean and Dawe, 2002)。然而, 繁多的病虫害严重影响我国的水稻生产, 其中褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål)是影响极为严重

基金项目: 国家"863"计划项目(2011AA10A203); 国家自然科学基金项目(31071745); 高等学校博士学科点专项科研基金(20093515110010)
作者简介: 邵恩斯, 男, 1985 年 11 月生, 福建福州人, 博士研究生, 研究方向为微生物农药, E-mail: scientistshao@126.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guanxfafu@126.com
收稿日期 Received: 2012-10-22; 接受日期 Accepted: 2012-12-30

的一种半翅目害虫。褐飞虱是一类具有暴发性、迁飞性、隐蔽性及毁灭性的水稻害虫，其主要依靠从水稻韧皮部刺吸汁液取食从而形成危害，影响水稻产量(Sogawa, 1982; Kanaoka *et al.*, 1996)。受到危害的水稻叶片干枯，分蘖枯萎呈现灼烧状(Bae and Pathak, 1970)。有数据显示，自1980年以来，每年有近50%的水稻田受到褐飞虱的危害，造成的一般性损失达10%~20%，严重时达到40%~60%(程遐年等, 2003)。除了因刺吸式口器取食韧皮部对水稻造成的直接伤害，褐飞虱还与其他多种刺吸式口器半翅目害虫一样能够作为许多水稻病毒病的载体传播水稻病毒，从而对水稻产生严重的间接伤害(Brown and Bird, 1992)。有研究显示，褐飞虱能够传播包括水稻草矮病毒(rice grassy stunt virus, RGSV)及水稻齿叶矮缩病毒(rice ragged stunt virus, RRSV)在内的多种水稻病毒。这些病毒病均可通过褐飞虱传播，对水稻生产造成极其严重的危害(Hogenhout *et al.*, 2008)。

植物病毒与媒介昆虫在分子层面的关系往往与植物病毒依靠媒介昆虫进行传播息息相关，而病毒颗粒与媒介昆虫中肠内受体的结合是最为关键的一步。以RRSV为例，该病毒首先与褐飞虱中肠上皮细胞上的受体结合，而后穿过中肠及后肠的脏肌组织，最后进入唾腺(Jia *et al.*, 2012)。此外，Liu等(2010)利用能够与豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 中肠内膜结合的短肽GBP3.1成功阻止了黄矮病毒(luteovirus)与豌豆蚜中肠的结合。因此，筛选能够与褐飞虱中肠内膜结合的短肽能够为阻止RRSV等水稻病毒通过褐飞虱进行传播提供帮助。

另一方面，许多膜穿孔毒素的受体蛋白都存在于靶标昆虫的中肠内。例如苏云金杆菌(*Bacillus thurigiensis*, Bt) Cry毒素蛋白δ-内毒素(δ-endotoxins)、Cyt毒素蛋白(cytolysins)、营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, VIPs)等都需要先与靶标昆虫中肠内的一种或多种受体蛋白结合后才能够形成膜穿孔作用，最后杀死害虫(Knight *et al.*, 1994; Vadlamudi *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2003; Jurat-Fuentes and Adang, 2004; Jurat-Fuentes and Adang, 2006; Bravo *et al.*, 2007; Pigott and Ellar, 2007; Gómez *et al.*, 2007, 2012; Lu *et al.*, 2012)。然而，上述膜穿孔毒素蛋白防治褐飞虱等半翅目害虫的报道尚少见。有研究显示，转Bt *cry*基因水稻对褐飞虱的存活率、种群数量及繁殖能力没有显著影响(Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011)。此外还有研究报道，Bt Cry毒素对蚜虫(另一种具有刺吸式口器的半翅目昆虫)具有较弱的毒性作用，如Cry2，Cry3A及Cry4在极高的剂量下才能对马铃薯长管蚜 *Macrosiphum euphorbiae* 产生较低的毒性作用(Walters *et al.*, 1994; Walters and English, 1995)。Porcar等(2009)发现以125~500 μg/mL的Cry3A，Cry4Aa及Cry11Aa毒素蛋白分别饲喂豌豆蚜 *A. pisum* 后，才产生较低的毒性作用。Li等(2011)及我们未发表的实验结果均显示半翅目蚜虫和褐飞虱之所以对Cry毒素不敏感，主要是由于Cry毒素无法正确识别此类害虫肠道内的受体蛋白所致。同时，对豌豆蚜的转录组分析发现其中肠内同样具有极高丰度的APN与ALP受体蛋白(Liu *et al.*, 2012)，因此，设法定向改造Cry等膜穿孔毒素蛋白，使其能够正确识别褐飞虱肠道内的受体蛋白，是研究防治褐飞虱等刺吸式口器半翅目害虫毒素蛋白的可行途径。

噬菌体展示技术(phage display)是一种能够将噬菌体蛋白基因与外源肽或蛋白DNA序列进行融合表达，并呈现在噬菌体表面的技术。该技术可用于筛选与靶标蛋白结合的短肽序列(Azzazy and Highsmith, 2002; Mullen *et al.*, 2006)。本研究结合噬菌体短肽文库展示技术和膜饲喂法，模拟褐飞虱正常的刺吸取食方式，将短肽文库溶液饲喂给褐飞虱若虫，从而筛选出能够与褐飞虱中肠内膜结合的短肽；而后利用加强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)作为标签，对短肽与褐飞虱中肠内膜的结合活性进行了形态学的验证，证明筛选到的短肽P2S能够与褐飞虱中肠内膜结合。本研究筛选到的结合短肽P2S能够为阻止以褐飞虱为载体的水稻病毒传播提供帮助。此外，由于短肽P2S可能识别某些褐飞虱中肠内潜在的膜穿孔毒素受体蛋白，因此，该短肽可为定向改造对褐飞虱具有毒性作用的新型膜穿孔毒素打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

褐飞虱 *N. lugens* 卵期、若虫期及成虫期均以水稻苗饲养于塑料组织培养罐中，置于气候培养箱内。饲养条件为：温度28±1℃，相对湿度80%±4%，光照时间14~16 h。

1.2 供试菌株及主要试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)及 *egfp* 质粒 DNA 为本实验室保存，pET32a 表达载体购于 Novagen，高保真酶 Taq Plus DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术服务有限公司，限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶购自上海宝生生物技术服务有限公司(TaKaRa)，DNA 回收试剂盒购于 BIOMIGA，Ni Sepharose 6 Fast Flow 组氨酸纯化填料购于 GE Healthcare。

1.3 褐飞虱在膜饲喂法下的取食率调查

参照已报道的文献(Chay *et al.*，1996)对膜饲喂法进行部分改良后饲喂褐飞虱若虫，以确定膜饲喂法对褐飞虱的可行性。取一支 25 mL 广口玻璃三角瓶，底部打开一个直径 1 cm 的透气孔并用纱布包裹，瓶身用潮湿黑色棉布包裹用于避光及保湿。取 20 头 3 ~4 龄褐飞虱若虫置于瓶中，开口用充分拉伸的蜡质封口膜(parafilm)包裹后，在膜上滴加 30 μL 混有 0.1% 苋莱红染料(w/w)及 25% 蔗糖(w/v)的 PBS 缓冲液(pH 7.0)后，再以一层蜡质封口膜包裹。三角瓶置于 28℃，相对湿度 80% 的气候培养箱中。瓶内褐飞虱若虫能够自然地用其口针穿过内层膜取食两层膜之间的溶液。试验按时间梯度共分 4 组，每组 5 次重复。分别在 1，8，16 和 24 h 后测定取食率，达到饲喂时间后将管内若虫取出，在解剖镜下观察虫体并解剖分离消化道，确定取食与否，统计取食数量，通过 Excel 2007 分析取食率趋势。

1.4 褐飞虱中肠内膜结合短肽序列的筛选

利用噬菌体短肽文库展示技术筛选能够与褐飞虱中肠内膜结合的短肽序列。采用的噬菌体短肽文库为含有 7 个随机氨基酸序列的 M13 噬菌体短肽文库 Phage Library C7C (New England BioLabs, NEB)。该文库能够将人工改造的随机七肽展示在噬菌体衣壳表面并在随机短肽的两端分别添加一个半胱氨酸，以促进短肽成环。应用噬菌体短肽文库的前期准备工作包括噬菌体短肽文库滴度测定、宿主细菌 ER2738 的培养等参照 C-7-C Phage Display Library Kit 说明书进行。

首先用含 25% 蔗糖的 PBS 缓冲液(pH 7.0)将 10 μL 噬菌体短肽文库溶液(滴度大于 10^{12})稀释 10 倍后分为 3 等份，分别通过膜饲喂法在室温下饲喂给 3 组褐飞虱 3 ~4 龄若虫(每组 20 头)。饲喂 16 h 后，解剖受试若虫，取其肠道组织重悬于含有 1% BSA (w/v)的 100 μL PBS (100 mmol/L，pH 7.0)中。将获得的中肠组织用玻璃匀浆器捣碎后 1 000 g 4℃离心 1 min。取上清至洁净的离心管中(该上清含有未结合的噬菌体)，沉淀物用 500 μL 含 1% BSA 的 PBS 重悬以清洗未结合的噬菌体。重悬后的组织再次离心，重复清洗 2 次，以彻底除去未结合噬菌体。在清洗后的沉淀中加入 150 μL 洗脱缓冲液(50 mmol/L glycine-HCl，pH 2.2，1 mg/mL BSA)并在室温下慢摇培育 8 min 以洗脱与褐飞虱中肠内膜组织结合的噬菌体。经 1 000 g 4℃离心 5 min 后，上清转入洁净的 1.5 mL 离心管中，加入 8 μL 2 mol/L Tris-HCl (pH 9.1) 中和溶液。取 20 μL 洗脱的结合噬菌体溶液用于滴度测定，以确定淘洗后的噬菌体数量。剩余约 130 μL 结合噬菌体被加入到准备好的宿主菌 ER2738 培养基中进行扩增。在效价测定合格后(效价大于 10^{12})扩增的噬菌体将被再次以相同的方法饲喂给 60 头褐飞虱 3 ~4 龄若虫(分 3 瓶，每瓶 20 头)，进行第 2 次生物淘洗。重复上述生物淘洗步骤 3 轮后，将洗脱的噬菌体平铺在 LB/IPTG/X-gal 四环素(20 μg/mL)抗性平板上培养 16 h。挑取 30 个噬菌斑分别培养扩增后，参照 C-7-C Phage Display Library Kit 说明书中噬菌体单链 DNA 提取及纯化步骤提取每个噬菌体的单链 DNA。利用噬菌体测序引物(5′-^{HO}CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3′)对 30 个噬菌体单链 DNA 进行测序，从而筛选插入在噬菌体内能够与褐飞虱中肠内膜结合的短肽序列。同时，从第一轮清洗出的未结合噬菌体中筛选出一株进行扩增测序，作为不能结合短肽的阴性对照。

1.5 *p2s/unbp-egfp* 融合基因表达载体的构建

为了证明短肽与褐飞虱中肠内膜的结合活性，采用增强绿色荧光蛋白作为定位标记。为了构建 *p2s/unbp-egfp* 融合基因，根据已有的 *egfp* 基因序列及通过测序获得的结合短肽 P2S、不结合短肽 UNBP 的核苷酸序列设计 5 条 PCR 引物(表 1)。引物 P2S-EcoRⅠ为正向引物，包含短肽 P2S 的部分核苷酸序列及酶切位点 *Eco*RⅠ。引物 FP2S-EGFP 为正向引物，包含短肽 P2S 的全部核苷酸序列及 *egfp* 基因 5′端部分序列。上述两条引物主要用于 *p2s-egfp* 融合基因的制备。引物 UNBP-EcoRⅠ为正向引物，包含短肽 UNBP 的部分核苷酸序列及酶切位点 *Eco*RⅠ。引物 FUNBP-EGFP 为正向引物，包含短肽 UNBP 的全部核苷酸序列及 *egfp* 基因 5′端部分序列。上述两条引物主要用于 *unbp-egfp* 融合基因的制备。反向引物均为 EGFP-XhoⅠ。PCR 反应

采用高保真 pfu DNA 聚合酶(Fermentas)。PCR 反应体系为 25 pmol P2S/UNBP-EcoR Ⅰ, 1 pmol FP2S/FUNBP-EGFP, 25 pmol EGFP-Xho Ⅰ及 5 U 高保真 pfu DNA 聚合酶, 总体积 50 μL。PCR 反应条件为: 95℃ 2 min; 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 5 个循环; 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。获得的 PCR 产物分别于 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测。

PCR 扩增获得的 *p2s-egfp* 与 *unbp-egfp* 融合基因分别经 *Eco*R Ⅰ及 *Xho* Ⅰ末端酶切处理后利用 T4 DNA 连接酶(TaKaRa)插入同样被 *Eco*R Ⅰ及 *Xho* Ⅰ双酶切线性化处理的载体 pET32a 质粒中。连接体系为 0.5 μL T4 DNA 连接酶, 5 μL T4 DNA 连接缓冲液, 4 μL *p2s/unbp-egfp*, 1 μL pET32a 质粒, 4℃连接过夜。连接产物转化入大肠杆菌 BL21(DE3)中, 并通过氨苄抗性平板筛选阳性克隆。应用 *Eco*R Ⅰ及 *Xho* Ⅰ双酶切对阳性克隆质粒进行验证。*p2s-egfp*-32a 及 *unbp-egfp*-32a 质粒分别由上海宝生生物技术有限公司(TaKaRa 公司)测序, 以确定短肽 P2S 或 UNBP 核苷酸成功连于 *egfp* 基因 5′端。

表 1　*p2s/unbp-egfp* 融合基因制备引物

Table 1　Primers for preparation of *p2s/unbp-egfp* fusion gene

引物 Primers	核苷酸序列 Nucleotide sequences (5′-3′)
P2S-EcoR Ⅰ	CCGGAATTCtgtttgatgtcgtcg
FP2S-EGFP	tgtttgatgtcgtcgcaggcggcgtgcATGAGTAAAGGAGAAGAA
UNBP-EcoR Ⅰ	CCGGAATTCtgtattcaacccaac
FUNBP-EGFP	tgtattcaacccaacctcaatcattgcATGAGTAAAGGAGAAGAA
EGFP-Xho Ⅰ	CCGCTCGAGTTATTTGTATAGTTCATCCAT

引物序列中 *Eco*R Ⅰ及 *Xho* Ⅰ酶切位点都以下划线标出, 短肽 P2S 及 UNBP 核苷酸序列以小写字母标出。The enzyme sites of *Eco*R Ⅰ and *Xho* Ⅰ are underlined, and the lowercase bases indicate the nucleotide sequence of P2S or UNBP.

1.6　P2S-EGFP 融合蛋白的表达及纯化

将获得的 *p2s-egfp*-32a、*unbp-egfp*-32a 亚克隆进行原核诱导表达。挑取 *p2s-egfp*-32a 单克隆, 接入终浓度为 50 μg/mL 氨苄青霉素的 50 mL LB 培养基中, 37℃ 200 r/min 过夜活化。按 1% 转接入含有终浓度为 50 μg/mL 氨苄青霉素的 100 mL LB 培养基中, 经 37℃ 200 r/min 培养至对数前期(OD_{600} ≈ 0.5)时, 加入终浓度为 0.8 mmol/L 的 IPTG, 在 26℃ 150 r/min 16 h 以诱导目的蛋白表达。

诱导后的培养液在 10 000 g 4℃ 离心 1 min, 收集菌体, 沉淀经 His 标签蛋白纯化结合缓冲液(20 mmol/L Na_3PO_4, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L imidazole, pH 7.4)清洗 3 次, 用 10 mL His 标签蛋白纯化结合缓冲液重悬, 超声波(60 kHz)破碎 5 min, 4℃ 14 000 g 离心, 取上清可溶蛋白, 利用 His 标签蛋白纯化填料(Ni sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare), 根据说明书进行批量纯化, 最后用 His 标签蛋白纯化洗脱缓冲液(20 mmol/L Na_3PO_4, 0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole, pH 7.4)洗脱, 获得纯化的 P2S-EGFP 目的蛋白。UNBP-EGFP 纯化蛋白采用相同的方法进行制备。纯化后的 P2S-EGFP 及 UNBP-EGFP 可溶蛋白分别在 12% SDS-PAGE 上检测后, 利用 Bradford 试剂盒(Biomiga)测定蛋白浓度并于 -70℃保存备用。

1.7　短肽与褐飞虱中肠内膜结合活性验证

筛选到的短肽与褐飞虱中肠内膜结合活性的验证采用形态学方法。取 10 μL P2S-EGFP 融合蛋白(1 mg/mL)用含 25% 蔗糖的 PBS 缓冲液(pH 7.0)稀释至 100 μL, 通过膜饲喂法喂食 20 头褐飞虱 3~4龄若虫 16 h。解剖虫体, 分离中肠, 在荧光显微镜(Olympus IX71)下观察是否有明显的绿色荧光反应。同时, 取相同浓度的 UNBP-EGFP 及含 25% 蔗糖的 PBS 缓冲液分别通过改良后的膜饲喂法饲喂给 20 头褐飞虱 3~4 龄若虫, 解剖虫体, 分离中肠, 在荧光显微镜下观察绿色荧光反应, 作为阴性对照。

2　结果与分析

2.1　用改良膜饲喂法将含苋菜红染料及蔗糖的 PBS 缓冲液饲喂褐飞虱后的取食率

用含 0.1% 苋菜红染料(w/w)及 25% 蔗糖(w/v)的 PBS 缓冲液(pH 7.0)成功饲喂的褐飞虱虫体呈现红色, 解剖后肠道内含有红色内容物(图 1: A, B), 而未取食的稻飞虱虫体无红色, 解剖后中肠呈白色透明状(图 1: C, D)。取食率计算结果(图 2)表明, 饲喂 1 h 后褐飞虱若虫的平均取食率约为 26%, 饲喂 8 h 后约为 56%, 饲喂 16 h 后约为 91%, 饲喂 24 h 后约为 95%。

2.2　噬菌体短肽文库筛选能够与褐飞虱中肠内膜结合的短肽序列

将噬菌体短肽文库溶液通过膜饲喂法喂食褐飞虱 3~4 龄若虫。经过 3 轮生物淘洗后, 挑取 30 个噬菌斑进行扩增, 并测定噬菌体单链 DNA 序列, 获得若干能够与褐飞虱中肠内膜结合的短肽序列。其

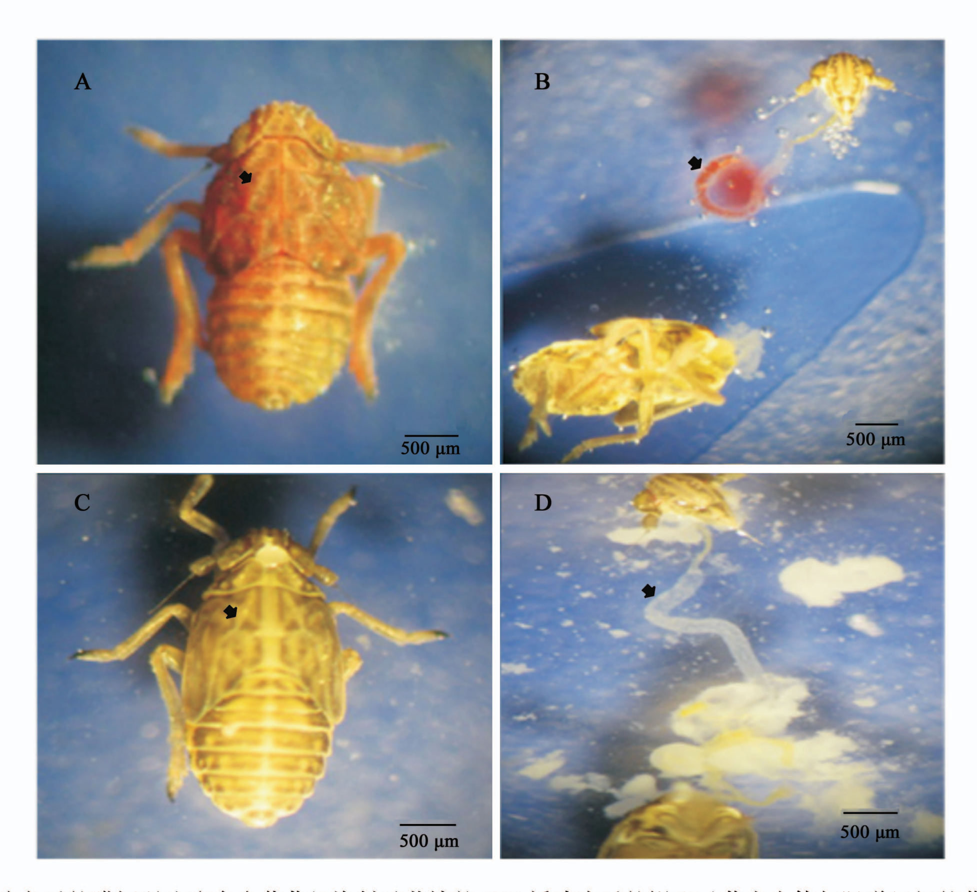


图 1　通过改良后的膜饲喂法取食含苋菜红染料及蔗糖的 PBS 缓冲液后的褐飞虱若虫虫体与肠道组织的荧光显微观察

Fig. 1　Observation on body and gut tissues of *Nilaparvata lugens* nymphs fed with PBS buffer containing amaranth and sucrose by improved membrane feeding method under fluorescence microscope

利用膜饲喂法将混有 0.1% 苋菜红染料及 25% 蔗糖的 PBS 缓冲液饲喂褐飞虱若虫 16 h 后，成功取食的若虫虫体呈红色，解剖后的肠道内含有红色溶液。未取食的若虫虫体及肠道均未呈红色。PBS buffer containing 0.1% amaranth and 25% sucrose was fed to *N. lugens* nymphs for 16 h by membrane feeding. The body of the fed nymphs was red, while that of the unfed nymphs was yellow, and the gut of the fed nymphs contained red solution, while that of the unfed nymphs did not. A：成功取食后的褐飞虱若虫虫体（箭头所指虫体背部呈现红色）Body of a fed nymph (the arrow indicates that the back of the fed nymphs was red)；B：成功取食后的褐飞虱中肠（箭头所指肠道内部有红色染料）Midgut of a fed nymph (the arrow indicates that red dye was contained in the midgut of the fed nymphs)；C：未成功取食的褐飞虱虫体（箭头所指虫体背部仍为黄色）Body of an unfed nymph (the arrow indicates that the back of the unfed nymphs remained yellow)；D：未成功取食的褐飞虱中肠（箭头所指肠道内没有红色染料）Midgut of an unfed nymph (the arrow indicates that red dye was not contained in the midgut of the unfed nymphs).

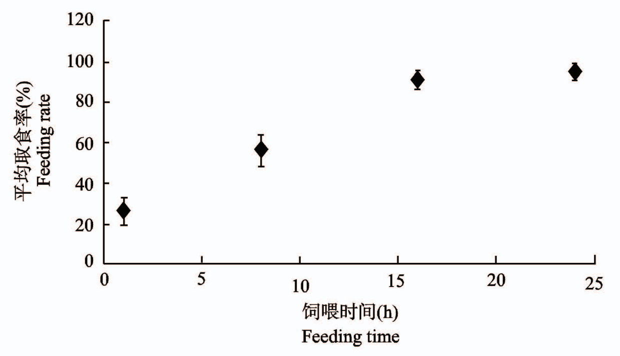


图 2　膜饲喂法饲喂含苋菜红染料及蔗糖的 PBS 后褐飞虱若虫的取食率

Fig. 2　Feeding rate of *Nilaparvata lugens* nymphs after feeding PBS buffer containing amaranth and sucrose

中，有 9 个噬菌体带有相同的短肽序列 CLMSSQAAC，将其命名为 P2S。该短肽序列在后续重复实验中也多次出现。为了对噬菌体短肽文库的多样性进行确定，从原始肽库、第一轮淘洗扩增后的肽库、第二轮淘洗扩增后的肽库中分别随机挑取 10 个噬菌斑进行测序。原始肽库中 P2S 并未出现，且 10 个噬菌体都展示了不同的短肽序列；第一轮淘洗扩增后的肽库中 P2S 也未出现，第二轮淘洗扩增后的肽库中 P2S 出现 3 次。同时，从第一轮淘洗中清洗掉的未结合噬菌体中挑选 1 株，经测序获得短肽序列 CIQPNLNHC，作为不能与褐飞虱中肠内膜结合的阴性对照，命名为 UNBP。

2.3 *p2s/unbp-egfp* 融合基因表达载体的构建

通过 PCR 方法将短肽 P2S 的核苷酸序列与 *egfp* 基因相连，构建了 *p2s-egfp* 融合基因。同时，将短肽 UNBP 核苷酸序列与 *egfp* 基因相连，构建 *unbp-egfp* 融合基因。PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测，分别获得 1 条 753 bp 的阳性条带（图 3）。将 *p2s-egfp* 及 *unbp-egfp* 融合基因分别用 *Eco*R Ⅰ与 *Xho* Ⅰ 末端酶切处理后与同样被 *Eco*R Ⅰ与 *Xho* Ⅰ线性化处理的 pET32a 表达载体相连构建 *p2s-egfp*-32a 及 *unbp-egfp*-32a 质粒，而后转化入大肠杆菌 BL21（DE3）细胞中，筛选阳性克隆。阳性克隆质粒用 *Eco*R Ⅰ与 *Xho* Ⅰ进行双酶切验证，经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，分别获得 1 条 5 900 bp 的条带（pET32a）及 1 条 753 bp 的条带（*p2s/unbp-egfp*）（图 4）。结果表明 *p2s-egfp*-32a 及 *unbp-egfp*-32a 质粒已成功构建。

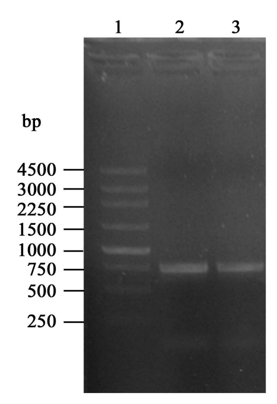


图 3 *p2s/unbp-egfp* 的克隆

Fig. 3 Amplification of *p2s/unbp-egfp*

1：DNA 分子量标准物 DNA marker；2：*p2s-egfp*；3：*unbp-egfp*.

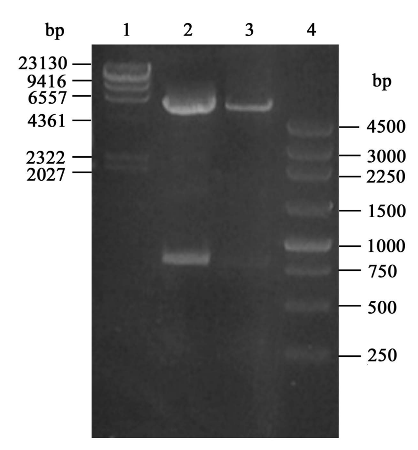


图 4 双酶切验证 *p2s/unbp-egfp*-32a 质粒的构建

Fig. 4 Double enzyme digestion of *p2s/unbp-egfp*-32a plasmid

1，4：DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker；2：*Eco*R Ⅰ与 *Xho* Ⅰ双酶切 *p2s-egfp*-32a 质粒 *p2s-egfp*-32a plasmid digested by *Eco*R Ⅰ and *Xho* Ⅰ；3：*Eco*R Ⅰ与 *Xho* Ⅰ双酶切 *unbp-egfp*-32a 质粒 *unbp-egfp*-32a plasmid digested by *Eco*R Ⅰ and *Xho* Ⅰ.

2.4 P2S/UNBP-EGFP 融合蛋白的表达及纯化

p2s-egfp-32a 及 *unbp-egfp*-32a 质粒转化入大肠杆菌 BL21（DE3）后，分别通过 IPTG 诱导 P2S-EGFP 及 UNBP-EGFP 融合蛋白的表达。诱导后的细胞经超声波破碎并利用 Ni Sepharose 6 Fast Flow（GE Healthcare）填料对蛋白进行批量纯化，获得纯化的 P2S-EGFP 及 UNBP-EGFP 融合蛋白。由于采用 pET32a 作为表达载体，因此融合蛋白的 N 端均含有表达的 TRX 及 His 标签。纯化后的融合蛋白利用 SDS-PAGE 电泳检测后获得 1 条约 46 kDa 的条带（图 5）。

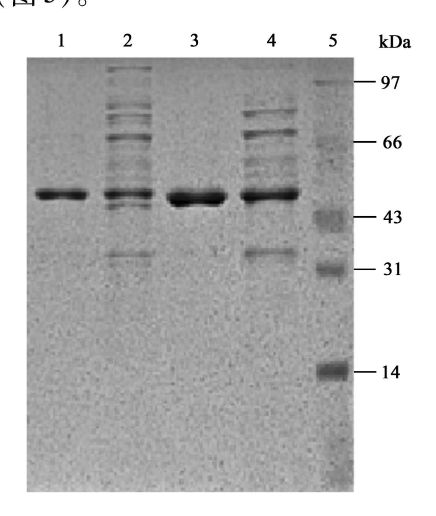


图 5 P2S/UNBP-EGFP 融合蛋白的表达及纯化

Fig. 5 Expression and purification of P2S/UNBP-EGFP fusion protein

1：纯化后的 P2S-EGFP（Purified P2S-EGFP）；2：未纯化的 P2S-EGFP（Unpurified P2S-EGFP）；3：纯化后的 UNBP-EGFP（Purified UNBP-EGFP）；4：未纯化的 UNBP-EGFP（Unpurified UNBP-EGFP）；5：蛋白分子量标准物（Protein molecular weight marker）.

2.5 短肽与中肠内膜的结合活性验证

将 P2S-EGFP、UNBP-EGFP 融合蛋白分别混于含 25% 蔗糖的 PBS（w/v）中，通过膜饲喂法喂食褐飞虱 3～4 龄若虫后，解剖其肠道，置于荧光显微镜下观察。取食了结合短肽 P2S-EGFP 融合蛋白的若虫肠道中能够看到明显的绿色荧光（图 6：A，B），而取食了不能结合短肽 UNBP-EGFP 融合蛋白的若虫肠道中却没有明显的绿色荧光反应（图 6：C，D）。同时作为阴性对照的直接饲喂含 25% 蔗糖的 PBS 缓冲液的若虫肠道中同样没有明显的绿色荧光反应（图 6：E，F）。该结果证明短肽 P2S 具有与褐飞虱中肠内膜结合的能力。

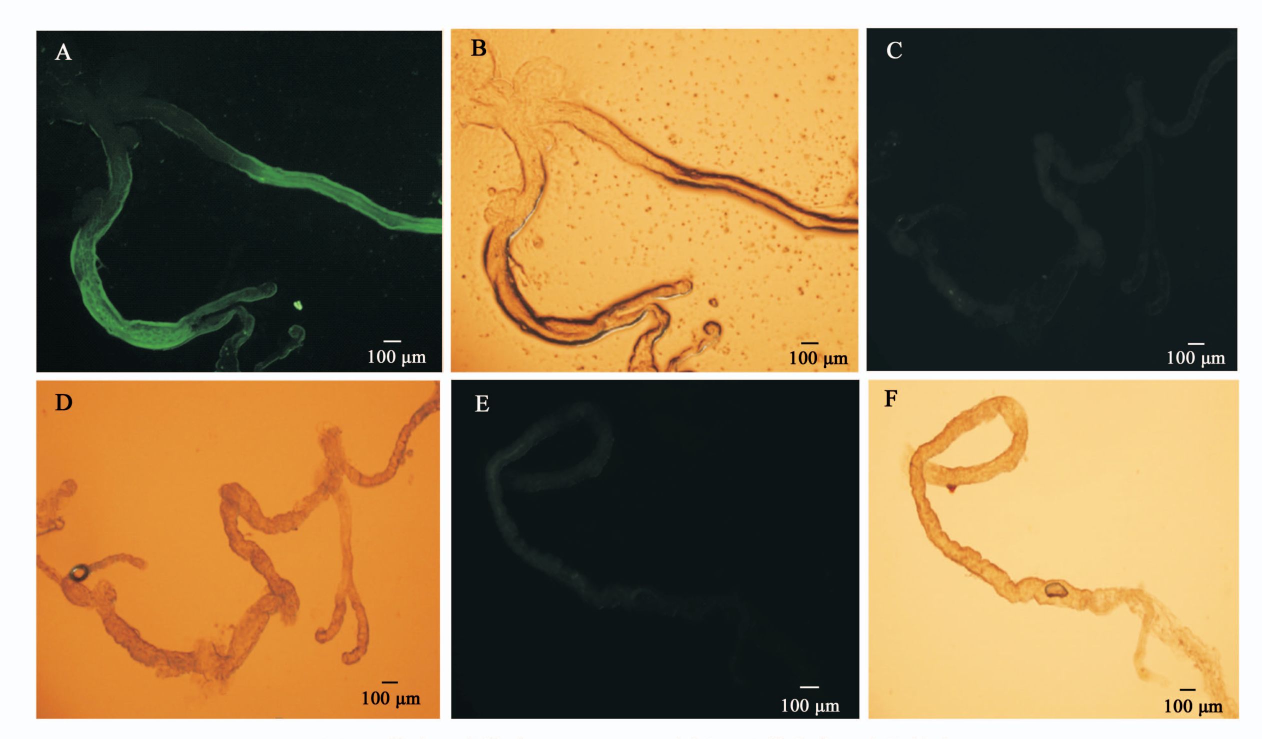


图 6　荧光显微镜验证 P2S-EGFP 在褐飞虱若虫中肠内的结合

Fig. 6　Confirmation of binding activity of P2S-EGFP to midgut inner membrane in *Nilaparvata lugens* nymphs under fluorescence microscope

A：取食 P2S-EGFP 融合蛋白的褐飞虱若虫中肠在荧光显微镜中呈现绿色荧光 Green fluorescence from the midgut of nymphs feeding P2S-EGFP under fluorescence microscope；B：取食 P2S-EGFP 融合蛋白的褐飞虱若虫中肠白光下对照 White light control of the midgut of nymphs feeding P2S-EGFP；C：取食 UNBP-EGFP 融合蛋白的褐飞虱若虫中肠在荧光显微镜下未呈现明显的绿色荧光 No obvious green fluorescence from the midgut of nymphs feeding UNBP-EGFP under fluorescence microscope；D：取食 UNBP-EGFP 融合蛋白的褐飞虱若虫中肠在白光下对照 White light control of the midgut of nymphs feeding UNBP-EGFP；E：取食只含 25% 蔗糖 PBS 缓冲液的褐飞虱若虫中肠在荧光显微镜下未呈现明显绿色荧光 No obvious green fluorescence from the midgut of nymphs feeding PBS buffer containing 25% sucrose only under fluorescence microscope；F：取食只含 25% 蔗糖的 PBS 缓冲液的褐飞虱若虫中肠在白光下对照 White light control of the midgut of nymphs feeding PBS buffer containing 25% sucrose only.

3　讨论

由于褐飞虱采用刺吸式口器取食且活动力较强，因此针对褐飞虱昆虫的生测难度较大，当前研究多直接采用水稻饲喂，否则取食率无法得到保证。本研究采用改良膜饲喂法，扩大了一般膜饲喂法的取食面积及褐飞虱的活动空间，使得褐飞虱若虫在饲喂 16 h 后取食率稳定在 90% 以上。此外，采用该方法饲喂褐飞虱还能够较好地模拟褐飞虱利用刺吸式口器刺吸取食的条件，从而获得更可信的实验结果。该结论不仅为后续采用噬菌体短肽文库展示技术筛选与褐飞虱中肠内膜结合短肽实验提供依据，也为针对褐飞虱所进行的可溶试剂生物活性测定奠定基础。

通过将噬菌体短肽文库成功饲喂给褐飞虱若虫，从而筛选出一条具有与褐飞虱肠道内膜结合活性的短肽 P2S 和一条不具有结合活性的短肽 UNBP。将 *egfp* 基因与 P2S、UNBP 的核苷酸序列分别连接后进行融合表达，以 EGFP 作为荧光标记，在荧光显微镜下观察取食了 P2S-EGFP 蛋白或 UNBP-EGFP 蛋白的褐飞虱若虫肠道，前者能借助 EGFP 产生荧光作用，证明了短肽 P2S 能够与褐飞虱肠道内膜结合。后者无荧光作用，说明 UNBP 未显示出结合活性。由于褐飞虱是重要的水稻病毒传播媒介昆虫，其中肠中存在包括 RGSV 和 RRSV 等多种水稻病毒受体。由于筛选获得的 P2S 与褐飞虱中肠内膜具有较好的结合能力，后续研究可以此为基础，尝试利用含短肽 P2S 的大分子蛋白饲喂褐飞虱，以覆盖褐飞虱中肠中潜在的 RGSV 和 RRSV 等水稻病毒受体，尝试阻止褐飞虱成为这些病毒的媒介昆虫。

另一方面，由于膜穿孔毒素 Cry，Cyt 及 VIPs 与靶标昆虫中肠受体(主要为 Cadherin、APN、ALP

及部分醣脂类蛋白)的结合在其毒性机理中的重要作用。而当前研究发现虽然半翅目昆虫中肠内同样存在 APN 与 ALP 等受体蛋白，但这些受体蛋白的同源性与鳞翅目、鞘翅目昆虫的受体蛋白存在差距。因此，Cry 等毒素无法与飞虱、蚜虫中肠内的受体正确结合。由于本研究筛选出的短肽 P2S 能够与褐飞虱中肠内膜广泛结合，因此该短肽很可能与单个或多个膜穿孔毒素受体具有结合作用。又因为 P2S 序列由 9 个氨基酸组成，N 端与 C 端都有一个半胱氨酸，使其具有较好的独立成环性，其结构与 Cry 毒素中决定受体识别的 3 个环区类似。因此，短肽 P2S 的获得，为定向改造膜穿孔毒素 Cry，Cyt 及 VIPs，研制防治褐飞虱的新型毒素提供了可行性。

参考文献 (References)

Azzazy HME, Highsmith WE, 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem.*, 35: 425 - 445.

Bae SHEE, Pathak MD, 1969. Life history of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) and susceptibility of rice varieties to its attacks. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 63: 149 - 155.

Bravo A, Gill SS, Soberon M, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423 - 435.

Brown J, Bird J, 1992. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Dis.*, 76: 220 - 225.

Chay C, Gunasinge U, Dinesh-Kumar S, Miller W, Gray SM, 1996. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus - PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology*, 219: 57 - 65.

Chen M, Liu Z, Ye G, Shen Z, Hu C, Peng Y, Altosaar I, Shelton AM, 2007. Impacts of transgenic *cry1Ab* rice on non-target planthoppers and their main predator *Cyrtorhinus lividipennis* (Hemiptera: Miridae) - a case study of the compatibility of Bt rice with biological control. *Biol. Control*, 42: 242 - 250.

Cheng XN, Wu JC, Ma F, 2003. Brown Planthopper: Occurrence and Control. China Agriculture Press, Beijing. [程遐年，吴进才，马飞，2003. 褐飞虱研究与防治. 北京：中国农业出版社]

Gómez I, Pardo-López L, Munoz-Garay C, Fernandez L, Pérez C, Sánchez J, Soberón M, Bravo A, 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28: 169 - 173.

Gómez JEC, López-Pazos SA, Cerón J, 2012. Determination of Cry toxin activity and identification of an aminopeptidase N receptor-like gene in *Asymmathetes vulcanorum* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Inverterbr. Pathol.*, 111: 94 - 98.

Han Y, Xu X, Ma W, Yuan B, Wang H, Liu F, Wang M, Wu G, Hua H, 2011. The influence of transgenic *cry1Ab/cry1Ac*, *cry1C* and *cry2A* rice on non-target planthoppers and their main predators under field conditions. *Agricultural Sciences in China*, 10: 1739 - 1747.

Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE, Redinbaugh MG, 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46: 327 - 359.

Jia D, Guo N, Chen H, Akita F, Xie L, Omura T, Wei T, 2012. Assembly of the viroplasm by viral non-structural protein Pns10 is essential for persistent infection of rice ragged stunt virus in its insect vector. *J. Gen. Virol.*, 93: 2299 - 2309.

Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Inverterbr. Pathol.*, 92: 166 - 171.

Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.*, 271: 3127 - 3135.

Kanaoka A, Yamaguchi R, Konno T, 1996. Effect of buprofezin on oviposition of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, at sub-lethal dose. *J. Pestic. Sci.*, 21: 153 - 158.

Knight PJK, Crickmore N, Ellar DJ, 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CrylA (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.*, 11: 429 - 436.

Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS, 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4648 - 4657.

Li H, Chougule NP, Bonning BC, 2011. Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harris). *J. Inverterbr. Pathol.*, 107: 69 - 78.

Liu S, Chougule NP, Vijayendran D, Bonning BC, 2012. Deep sequencing of the transcriptomes of soybean aphid and associated endosymbionts. *PLoS ONE*, 7: e45161.

Liu S, Sivakumar S, Sparks WO, Miller WA, Bonning BC, 2010. A peptide that binds the pea aphid gut impedes entry of pea enation mosaic virus into the aphid hemocoel. *Virology*, 401: 107 - 116.

Lu Q, Zhang YJ, Cao GC, Zhang LL, Liang GM, Lu YH, Wu KM, Gao XW, Guo YY, 2012. A fragment of cadherin-like protein enhances *Bacillus thuringiensis* Cry1B and Cry1C toxicity to *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Integr. Agric.*, 11: 628 - 638.

Maclean JL, Dawe DC, Hardy B, Hettel GP, 2002. Rice Almanac. 3rd ed. CABI Publishing, Wallingford, Oxon. 59 - 235.

Mullen LM, Nair SP, Ward JM, Rycroft AN, Henderson B, 2006. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends. Microbiol.*, 14: 141 - 147.

Pigott CR, Ellar DJ, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71: 255 - 281.

Porcar M, Grenier AM, Federici B, Rahbé Y, 2009. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins on the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 4897 - 4900.

Sogawa K, 1982. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, 27: 49 – 73.

Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla LAJr, 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 270: 5490 – 5494.

Walters F, Kulesza C, Phillips A, English L, 1994. A stable oligomer of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, CryIIIA. *Insect Biochem. Mol.*, 24: 963 – 968.

Walters FS, English LH, 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. *Entomol. Exp. Appl.*, 77: 211 – 216.

Wang Y, Zhang G, Du J, Liu B, Wang M, 2010. Influence of transgenic hybrid rice expressing a fused gene derived from *cry*1*Ab* and *cry*1*Ac* on primary insect pests and rice yield. *Crop Prot.*, 29: 128 – 133.

Xia H, Lu BR, Xu K, Wang W, Yang X, Yang C, Luo J, Lai F, Ye W, Fu Q, 2011. Enhanced yield performance of *Bt* rice under target-insect attacks: implications for field insect management. *Transgenic Res.*, 20: 655 – 664.

（责任编辑：赵利辉）